

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEIS
Internationales BÜ
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM



WO 9605296A1

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁶: C12N 15/10, C12Q 1/68</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/05296</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Februar 1996 (22.02.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01003</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juli 1995 (28.07.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 28 651.1 12. August 1994 (12.08.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTI- TUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE, E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GREULICH, Karl-Otto [DE/DE]; Plöck 27, D-69117 Heidelberg (DE). CELEDA, Dino [DE/DE]; Burgunderstrasse 36, D-67435 Neustadt (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PERREY, Ralf; Nymphenburger Strasse 147a, D- 80636 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>	

(54) Title: METHOD OF PREPARING AND AMPLIFYING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN

REACTION STARTING MATERIAL:

Reaktionsansatz:

AAA-----AAA

(Matrizenmolekül) (MATRIX MOLECULE)

|||||||

TTT-----TTT

(Startermolekül) (STARTER MOLECULE)

STEP (a)

Schritt (a):

AAA-----AAA

TTT-----TTT

STEP (b)

Schritt (b):

AAA-----AAA*****AAA (Reaktionsprodukt) (REACTION PRODUCT)

TTT*****TTT-----TTT (Reaktionsprodukt) (REACTION PRODUCT)

POSSIBLE REACTION PRODUCTS AFTER ONE REPETITION:

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

AAA-----AAA*****AAA

TTT*****TTT-----TTT

AAA-----AAA*****AAA*****AAA

TTT*****TTT*****TTT-----TTT

AAA-----AAA*****AAA*****AAA*****AAA

TTT*****TTT*****TTT*****TTT-----TTT

(57) Abstract

The invention concerns a method for the preparation and/or amplification of nucleic acids, as well as the use of nucleic acids prepared in this way and a kit containing them. In particular, the invention concerns a method of preparing and/or amplifying nucleic-acid sequences without the addition of so-called primers.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren, deren Verwendung sowie einen die erfindungsgemäß hergestellten Nukleinsäuren enthaltenden Kit. Insbesondere betrifft diese Erfindung ein Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen ohne Zugabe von Startern ("Primer").

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

Verfahren zur Herstellung und Amplifikation von Nukleinsäuren

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren ohne zusätzliche Zugabe von definierten Startern ("Primern"), die Verwendung dieser Nukleinsäuren sowie einen die erfindungsgemäß hergestellten Nukleinsäuren enthaltenden Kit.

Doppelsträngige Nukleinsäuresequenzen können durch Zugabe von für jeden der Stränge spezifischen Startern mit einer durch die Starter induzierten Verlängerungsreaktion unter Verwendung von Nukleotiden und einem für die Verlängerungsreaktion geeigneten Enzym amplifiziert werden. Diese als Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", "PCR") bezeichnete Reaktion ist in EP-B1-0 201 184 beschrieben. Insbesondere ist bei der PCR ein molarer Überschuß der als Starter fungierenden definierten Oligonukleotide ("Primer") erforderlich, um die gewünschte Amplifikation der doppelsträngigen Nukleinsäuresequenzen zu erhalten. Jeder durch einen der spezifischen Starter induzierte und enzymatisch synthetisierte Strang bildet im nächsten Reaktionszyklus die Matrize für einen durch den anderen Starter induzierten und enzymatisch zu synthetisierenden Strang, wobei die enzymatisch synthetisierten Stränge eines Zyklus jeweils zueinander komplementäre Nukleinsäuresequenzen sind. Die Reaktionszyklen können beliebig oft wiederholt werden, bis eine gewünschte Menge der doppelsträngigen Nukleinsäure im Reaktionsgemisch vorliegt. Nachteilig bei der PCR ist die zusätzliche Zugabe von Sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Primern, was voraussetzt, daß sich genau zu diesen Oligonukleotid-Sequenzen entsprechende komplementäre Sequenzen in den zu amplifizierenden Nukleinsäuremolekülen befinden müssen. Dies kann u.a. zu keinem Amplifikationsprodukt führen, wenn keine entsprechenden komplementären Sequenzen in den zu ampli-

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 2 -

fizierenden, doppelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren vorhanden sind. Ferner kann bei der PCR eine Amplifikation der Primer durch Selbst-Anlagerung ("Primer-Selfannealing") auftreten, was ein falsches Reaktionsprodukt sowie falsche Signale bei einer anschließenden *in situ* Hybridisierung mit den amplifizierten Nukleinsäuresequenzen zur Folge hat. Ferner wird im Reaktionsansatz für die PCR die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit Fremd-Nukleinsäuren erhöht, da durch die zusätzliche Zugabe der Starter zwei weitere Pipetierschritte notwendig sind.

Somit liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren bereitzustellen, das keine Zugabe von spezifischen Oligonukleotid-Primern erfordert, um aus kleinsten Mengen von Nukleinsäuren, ohne den Zusatz von synthetisch hergestellter Fremd-DNS in Form von Primern, große Mengen an Nukleinsäuren herzustellen. Desweiteren sollen "Primer-Selfannealing" und somit ungewünschte amplifizierte Nukleinsäuresequenzen vermieden und das Risiko einer Kontamination des Reaktionsansatzes mit Fremd-Nukleinsäuren minimiert werden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren gelöst, wobei der Reaktionsansatz ein einzelsträngig vorliegendes Nukleinsäuremolekül ("Startermolekül") mit einer als Starter wirkenden endständigen, vorzugsweise 3'-endständigen Nukleotidsequenz und ein einzelsträngig vorliegendes Nukleinsäuremolekül ("Matrizenmolekül") mit mindestens einer zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz eines Startermoleküls befähigten Nukleotidsequenz enthält, umfassend die Schritte

- (a) Anlagern der endständigen im Startermolekül enthaltenen Nukleotidsequenz an eine im Matrizenmolekül enthaltenen Nukleotidsequenz unter Bildung eines überstehenden Stranges des Matrizenmoleküls,
- (b) Synthetisieren eines Verlängerungsproduktes durch Induzieren mit der als Starter wirkenden endständigen

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 3 -

Nukleotidsequenz des Startermoleküls unter Verwendung des überstehenden Stranges des Matrizenmoleküls als Matrice in Gegenwart von Nukleotiden und mindestens einem zur Synthese des Verlängerungsproduktes geeigneten Agens, wobei eine das Verlängerungsprodukt enthaltende Nukleinsäure ("Reaktionsprodukt") erhalten wird,

- (c) Trennen des Reaktionsproduktes vom Matrizenmolekül, und
- (d) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (a) bis (c).

Der Begriff "Nukleinsäuremolekül" bedeutet ein natives, halbsynthetisches, synthetisches oder modifiziertes Nukleinsäuremolekül aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten Nukleotiden, wie Aminonukleotiden oder [α -S]-Triphosphatnukleotiden.

Der Begriff "Startermolekül" bedeutet ein vorstehend definiertes Nukleinsäuremolekül mit mindestens einer endständigen, vorzugsweise 3'-endständigen Nukleotidsequenz und einer die endständige Nukleotidsequenz flankierende Nukleotidsequenz, die vorzugsweise mindestens eine weitere zur Anlagerung an eine Nukleotidsequenz des Matrizenmoleküls befähigte Nukleotidsequenz enthält; vgl. Figuren 1 bis 7.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist diese weitere Nukleotidsequenz am anderen Ende des Startermoleküls, vorzugsweise 5'-endständig, lokalisiert.

Der Begriff "Matrizenmolekül" bedeutet ein vorstehend definiertes Nukleinsäuremolekül mit mindestens einer zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls befähigten Nukleotidsequenz; vgl. Figuren 1 bis 7.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Matrizenmolekül mindestens eine endständige, vorzugsweise 3'-endständige Nukleotidsequenz, die zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls befähigt ist.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 4 -

Der Begriff "Reaktionsansatz" bedeutet ein Reaktionsgemisch, das neben den Nukleotiden und mindestens einem zur Synthese des Verlängerungsproduktes geeigneten Agens ein oder mehrere Startermoleküle und ein oder mehrere Matrizenmoleküle enthält, wobei weitere, nicht an dem erfindungsgemäßen Verfahren beteiligte Nukleinsäuren vorhanden sein können. Die Startermoleküle und/oder die Matrizenmoleküle liegen in einer ausreichenden Konzentration, vorzugsweise mindestens etwa 1×10^{-15} g, im Reaktionsansatz vor.

Der Begriff "Anlagerung" bedeutet die Ausbildung von beispielsweise Wasserstoffbrücken zwischen einzelsträngigen, komplementären Bereichen von Nukleinsäuremolekülen, insbesondere zwischen den erfindungsgemäß definierten Nukleotidsequenzen der Startermoleküle und Matrizenmolekülen, bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise 90 °C oder weniger, und gegebenenfalls bei einer geeigneten Salzkonzentration, vorzugsweise 50 bis 300 mM.

Der Begriff "Verlängerungsprodukt" bedeutet eine an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls über beispielsweise eine Phosphodiester-, Thioester- oder Amidbindung kovalent gebundene, "synthetisierte" Nukleinsäuresequenz, deren Primärsequenz komplementär zu der entsprechenden Sequenz des Matrizenmoleküls ist.

Der Begriff "ein zur Synthese des Verlängerungsproduktes geeignetes Agens" bedeutet ein natives Enzym oder ein synthetisch hergestelltes Agens, welches bei der Synthese des Verlängerungsproduktes als Katalysator wirkt. Beispiele für native Enzyme sind die Taq-Polymerase, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, die *E. coli* DNA-Polymerase I und die Reverse Transkriptase.

Der Begriff "Reaktionsprodukt" bedeutet eine, das Verlängerungsprodukt enthaltende Nukleinsäure, wobei das Reaktionsprodukt *per se* bei jeder Wiederholung der Reaktionssequenz (a)

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 5 -

bis (c) als Startermolekül und/oder als Matrizenmolekül gemäß den vorstehend aufgeführten Definitionen verwendet werden kann.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind das Startermolekül und das Matrizenmolekül gleich, wobei das Matrizenmolekül (bzw. das Startermolekül) mindestens eine Nukleotidsequenz enthält, die zur Anlagerung an die endständige, vorzugsweise 3'-endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls (bzw. des Matrizenmoleküls) befähigt ist; vgl. Figur 3. Ferner kann das Matrizenmolekül (bzw. das Startermolekül) eine weitere Nukleotidsequenz enthalten, die zur Anlagerung der endständigen, vorzugsweise 3'-endständigen Nukleotidsequenz des Verlängerungsproduktes befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind das Startermolekül und das Matrizenmolekül gleich und das Matrizenmolekül (bzw. das Startermolekül) enthält mindestens eine am anderen Ende, vorzugsweise 5'-endständig, lokalisierte Nukleotidsequenz, die zur Anlagerung an die endständige, vorzugsweise 3'-endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls (bzw. des Matrizenmoleküls) befähigt ist; vgl. Figur 4.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält das Matrizenmolekül mindestens teilweise die komplementäre Sequenz des Startermoleküls, wobei das Matrizenmolekül mindestens eine, vorzugsweise zwei zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls befähigten Nukleotidsequenzen enthält; vgl. Figur 5. Vorzugsweise ist mindestens eine der zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls befähigten Nukleotidsequenzen des Matrizenmoleküls endständig, vorzugsweise 5'-endständig, lokalisiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Matrizenmolekül die komplementäre Sequenz des Startermoleküls, wobei mindestens zwei, vorzugsweise gleiche, zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Star-

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 6 -

termoleküls befähigte Nukleotidsequenzen endständig lokalisiert sind; vgl. Figur 6.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Startermolekül beispielsweise über eine Phosphodiester-, Thioester- oder Amidbindung kovalent an das Matrizenmolekül gebunden, so daß im Reaktionsansatz des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens eine Nukleinsäure vorliegt, die die Primärsequenzen des Startermoleküls und des Matrizenmoleküls gemäß den vorstehend aufgeführten Definitionen enthält. Die endständige, vorzugsweise 3'-endständige Nukleotidsequenz dieser Nukleinsäure ist die zur Anlagerung an mindestens eine im Matrizenmolekül enthaltene Nukleotidsequenz befähigte Nukleotidsequenz des Startermoleküls; vgl. Figur 7. Die im Matrizenmolekül enthaltene Nukleotidsequenz kann beispielsweise 3'- oder 5'-endständig sein.

Die zur Anlagerung ("Hybridisierung") befähigten Nukleotidsequenzen des Startermoleküls und/oder des Matrizenmoleküls sind vorzugsweise repetitive Sequenzen. Der Begriff "repetitive Sequenzen" bedeutet sich wiederholende Sequenzen, wobei unterschieden wird zwischen (1) repetitiven Genen, wie Gene von rRNA, tRNA, Histonen und Immunoglobulinen, (2) mittelrepetitiven Sequenzen, bestehend aus etwa 200 bis 300 Nukleotiden, und (3) hochrepetitive Sequenzen, bestehend aus kurzen Sequenzen von mindestens etwa 20 bp, die 1000fach wiederholt sein können und sich, wie bei der "Alu-Familie" von Eukaryoten (Sequenzen von 300 bp), über das ganze Genom verteilen.

Ferner können die zur Anlagerung befähigten Nukleotidsequenzen des Startermoleküls und/oder des Matrizenmoleküls mindestens eine Erkennungssequenz für Endonukleasen oder für andere Nukleinsäure-spaltende Agentien, wie "molecular scissors", die auf einer Ausbildung von triple-Helix-DNS-Erkennungssequenzen basieren, enthalten.

Zur Markierung der erfindungsgemäß hergestellten Reaktionsprodukte kann ein Teil der Nukleotide im Reaktionsansatz markiert

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 7 -

sein. Geeignete Markierungen sind beispielsweise mit Biotin, Digoxigenin oder Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nukleotide oder mit einem radioaktiven Isotop markierte Nukleotide. Ferner können die Reaktionsprodukte selbst markiert werden, beispielsweise durch den Einbau von markierten Nukleotiden mittels "Nick-Translation".

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der überstehende Strang des Matrizenmoleküls mit einer genetischen, kanzerogenen oder infektiösen Krankheit verbunden. In diesem Fall handelt es sich um spezifische Nukleinsäuresequenzen, die modifiziert oder nativ bzw. direkt oder indirekt die Induktion einer solchen Krankheit verursachen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren durchgeführt werden, wobei doppelsträngig vorliegende Nukleinsäuren vor Schritt (a) in einzelsträngige Nukleinsäuren nach im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie Hitze-Denaturierung oder pH-abhängige Denaturierung mit HCl oder NaOH, überführt werden.

Der Reaktionsansatz hat ein geeignetes Volumen, beispielsweise 20 bis 200 μ l, und enthält (1) eine für die Synthese des Verlängerungsproduktes geeignete Konzentration an gewünschten Nukleotiden, vorzugsweise 5 bis 100 nmol, mehr bevorzugt etwa 20 nmol, (2) für die Synthese des Verlängerungsproduktes ausreichende Einheiten eines synthetisierenden Agens, beispielsweise 1 bis 15 Einheiten, vorzugsweise 5 Einheiten Taq-Polymerase, und (3) mindestens etwa 1×10^{-15} g Startermoleküle und Matrizenmoleküle bzw. Nukleinsäuren, die das Startermolekül und das Matrizenmolekül kovalent miteinander verbunden enthalten, in einer geeigneten Reaktionslösung.

Die Reaktionslösung enthält vorzugsweise $MgCl_2$ (1 bis 200 mmol, bevorzugt 1 bis 50 mmol, mehr bevorzugt 1 bis 20 mmol und am meisten bevorzugt 3 mmol), NaCl (30 bis 300 mmol, bevorzugt 50 bis 250 mmol, mehr bevorzugt 100 bis 200 mmol und am meisten bevorzugt 160 mmol) und/oder KCl (10 bis 70 mmol,

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 8 -

bevorzugt 30 bis 70 mmol, mehr bevorzugt 40 bis 60 mmol und am meisten bevorzugt 50 mmol) und/oder Tris(hydroxymethyl)amino-methan (5 bis 50 mmol, bevorzugt 5 bis 30 mmol, mehr bevorzugt 5 bis 20 mmol und am meisten bevorzugt 10 mmol) und/oder Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) (0,01 bis 0,1 Vol.-%, bevorzugt 0,01 bis 0,06 Vol.-%, mehr bevorzugt 0,01 bis 0,04 Vol.-% und am meisten bevorzugt 0,02 Vol.-%) und gegebenenfalls Gelatine (0,1 bis 1 mmol). Der pH-Wert der Reaktionslösung liegt in einem geeigneten, insbesondere von dem synthetisierenden Agens abhängigen Bereich.

In Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens lagern sich die endständigen Nukleotidsequenzen der Startermoleküle an in den Matrizenmolekülen enthaltene Nukleotidsequenzen unter Bildung überstehender Stränge, die als Matrize wirken, an.

Diese Anlagerung wird bei im Reaktionsansatz zunächst doppelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren und vor Schritt (a) denaturierten und somit in Einzelstrangform überführten Nukleinsäuren auch als "versetzte Renaturierung" bezeichnet.

Die Anlagerung erfolgt bei einer Temperatur, die jeweils von der Art der im Reaktionsansatz vorliegenden Nukleinsäuren abhängt.

Beispielsweise wird die Anlagerung der Nukleinsäuremoleküle, die von chromosomaler DNS mit mittelrepetitiven und hochrepetitiven Sequenzen, beispielsweise "Alu-Sequenzen", stammen, bei einer Temperatur zwischen 70 und 90 °C durchgeführt. Dabei kann die Anlagerung derart erfolgen, daß gemäß Figur 7 die einzelsträngig vorliegende Nukleinsäure mit beispielsweise "inverted repeats" enthaltenden "Alu-Sequenzen" unter Bildung einer Schleife mit der endständigen, vorzugsweise 3'-endständigen Alu-Sequenz an eine in der Nukleinsäure enthaltene komplementäre "Alu-Sequenz" hybridisiert, wobei sich gemäß der vorstehend aufgeführten Definitionen die endständige "Alu-Sequenz" im Bereich des Startermoleküls und die komplementäre "Alu-Sequenz" im Bereich des Matrizenmoleküls befinden. Somit kann eine endständige "Alu-Sequenz" in Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens die Synthese eines Verlängerungspro-

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 9 -

duktes durch beispielsweise die Taq-Polymerase induzieren, wobei der überstehende Strang der einzelsträngigen Nukleinsäure als Matritze verwendet wird.

In beiden Fällen, nämlich "versetzte Renaturierung" oder Schleifenbildung bei chromosomaler DNS, ist die Temperatur der Anlagerung bzw. "Renaturierungstemperatur" von Bedeutung. Repetitive Sequenzen renaturieren aufgrund ihres häufigen Vorkommens und ihres zum Teil großen A-T Gehalts schneller. Hochrepetitive DNS renaturiert schon bei Temperaturen unter 90 °C. Die Renaturierung ist aber zum großen Teil unspezifisch, wodurch teilweise eine versetzte Anlagerung ("Hybridisierung") der einzelnen Stränge erreicht wird. Dies macht sich die vorliegende Erfindung zum Nutzen. Die schnelle Renaturierung der einzelsträngig vorliegenden Stränge bzw. die schnelle Renaturierung einer einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäure unter Schleifenbildung führt dazu, daß bei der erfindungsgemäßen Herstellung von Nukleinsäuren aus chromosomaler DNS der sogenannte "Annealingschritt", welcher bei der PCR erforderlich ist, unnötig ist. Dies führt dazu, daß in den chromosomalen Nukleinsäuren enthaltene "single copy" Gene bedeutend langsamer renaturieren und somit unter den gewählten Bedingungen von beispielsweise über 70 °C nicht oder nur viel langsamer renaturieren und damit keine Startsequenzen für eine Elongation bilden können. Wenn beispielsweise eine hochrepetitive Nukleinsäuresequenz vor dem "single copy" Gen in Synthesebzw. Elongationsrichtung vorliegt, bietet sich die Möglichkeit, das entsprechende Gen vollständig, d.h. einschließlich seiner "Exons" (kodierende Sequenzen) und seiner "Introns" (nicht-kodierende Sequenzen), herzustellen. Dies hat den Vorteil, daß in diesem Fall die genaue Sequenz des betreffenden Gens in der nativen DNS erhalten wird und man somit nicht auf Kopien ("cDNA") der mRNA der betreffenden Gene angewiesen ist, die keine Introns mehr enthalten. Diese Möglichkeit ist für die Analyse von beispielsweise des menschlichen Genoms von großer Bedeutung, da sie die Herstellung von spezi-

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 10 -

fischer DNS aus bestimmten Chromosomenregionen in Verbindung mit einer exakten Analyse des nativen Zustands erlaubt.

Bei der Amplifikation von doppelsträngig vorliegender cDNA (Menge im Reaktionsansatz vorzugsweise 1×10^{-9} bis 1×10^{-8} g, mehr bevorzugt 6×10^{-9} g), die "single copy"-Sequenzen repräsentieren und somit keine hochrepetitiven Abschnitte in ihrer Sequenz aufweisen, wird die Anlagerung je nach Zusammensetzung der Nukleinsäuresequenz bei einer Temperatur von etwa 40 bis 80 °C durchgeführt. Damit wird einzelnen zum Teil endständigen AT-reichen bzw. GC-reichen Bereichen der Startermoleküle ermöglicht, an komplementäre Nukleotidsequenzen entweder innerhalb der einzelsträngigen Nukleinsäuren unter Schleifenbildung oder versetzt zu renaturieren. Dabei sollte der Anlagerungsschritt zur Vermeidung einer vollständigen Renaturierung der zu amplifizierenden Nukleinsäuren eine Dauer von einer Stunde nicht überschreiten.

Alle vorstehenden Ausführungen zu Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens sind *mutatis mutandis* auf die Ausführungsform, bei der Startermolekül und Matrizenmolekül gleich sind, anwendbar.

In Schritt (b) wird die Synthese des Verlängerungsproduktes ("Elongation") bei einer Temperatur durchgeführt, die insbesondere von dem zur Synthese geeigneten Agens abhängt, wobei Reaktionsprodukte gemäß der vorstehend aufgeführten Definition erhalten werden. Beispielsweise erfolgt die Synthese bei Verwendung der Taq-Polymerase bei einer Temperatur zwischen 70 bis 80 °C, vorzugsweise 72 °C, für 1 bis 15 Minuten, vorzugsweise 5 Minuten.

In Schritt (c) wird das Trennen des Reaktionsproduktes vom Matrizenmolekül beispielsweise durch Erhitzen des Reaktionsgemisches ("Denaturierung") auf 90 bis 100 °C, vorzugsweise 95 °C, für 1 bis 15 Minuten, vorzugsweise 5 Minuten, erreicht.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 11 -

Die Reaktionssequenz (a) bis (c) wird in Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens einmal wiederholt. Insbesondere wird das erfindungsgemäße Verfahren 1 bis 200 mal, vorzugsweise 80 mal wiederholt, wobei nach jeder 40. Wiederholung gegebenenfalls weitere Einheiten des für die Synthese geeigneten Agens, beispielsweise 1 bis 15 Einheiten, vorzugsweise 5 Einheiten Taq-Polymerase zugegeben werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Reaktionsprodukte können mit geeigneten Verfahren und/oder Mitteln physikalisch (z.B. durch Ultraschall) und/oder chemisch (z.B. durch "molecular scissors") und/oder enzymatisch (z.B. durch Endonukleasen) mindestens einmal gespalten werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten und/oder amplifizierten Nukleinsäuren als Nukleinsäuresonden. Insbesondere können die erfindungsgemäß hergestellten und/oder amplifizierten Nukleinsäuren zu diagnostischen Zwecken in der Medizin sowie zu Forschungszwecken verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen und/oder von Nukleinsäuren, der mindestens eine erfindungsgemäß hergestellte und/oder amplifizierte Nukleinsäure enthält. Insbesondere kann der erfindungsgemäße Kit auf den Gebieten der biologischen Dosimetrie, der Tumorzytogenetik, der Mikrobiologie und der Evolutionsbiologie verwendet werden und hier zum Nachweis von genetischen, kanzerogenen oder infektiösen Krankheiten verwendet werden. Beispielsweise kann bei durch Retroviren ("temperente Phagen") verursachten infektiösen Krankheiten ein Reaktionsgemisch mit der Wirts-DNS und der Nukleinsäuresequenz der Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung erstellt werden. Dabei fungiert die spezifische Nukleinsäure der Phagen als Startermolekül und die Wirts-DNS als Matrize. Wenn eine Phageninfektion in der Wirts-DNS vorliegt, kann sich das Startermolekül der Phagennukleinsäure unter geeigneten Reaktionsbedingungen an

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 12 -

seine komplementäre Sequenz in der Wirts-DNS anlagern und seine Funktion als Starter übernehmen. Die Vorteile hierbei sind (1) der Nachweis einer Phageninfektion und (2) Erkenntnisse über den Inkorporationsmechanismus der betreffenden Phagennukleinsäure in die Wirts-DNS, da die Phagennukleinsäure als Starter fungiert und demgemäß die synthetisierten Sequenzen ("Elongationsprodukte") teilweise Sequenzen der nativen Wirts-DNS sind. Dadurch können neue Erkenntnisse bezüglich der für die Inkorporation in die Wirts-DNS benötigten Agenzien, beispielsweise Endonukleasen oder andere DNS-spaltende und/oder inkorporierende Agenzien, erhalten werden.

Die Figuren zeigen:

Figuren 1 bis 7 sind schematische Darstellungen bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, wobei (-) eine beliebiges Nukleotid bedeutet, (*) ein Nukleotid des Verlängerungsproduktes bedeutet und (|) komplementäre Nukleotide bedeuten.

Figur 8 ist die photographische Abbildung eines Agarosegels mit nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Amplifikationsprodukten. Es bedeuten (von links nach rechts): Bahn 1: DNS-Probe spezifisch für das Centromer des menschlichen Chromosoms #1 (pUC 1.77, Cooke et al., 1972); Bahn 2: mikrodissektiertes Chromosomensegment #1; Bahn 3: durch Mikrodissektion gewonnene Nukleinsäure-Probe spezifisch für das Centromer des menschlichen Chromosoms #8. (für die Bahnen 1 bis 3 wird jeweils der Amplifikationspuffer Nr.1 verwendet, die aufgetragene Menge beträgt jeweils 3 µl aus einem Endvolumen von 50 µl nach beendeter Amplifikation); Bahn 4: DNS-Längensstandardmarker Nr. III (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) (aufgetragene Menge 500 ng); und Bahnen 5 bis 8: wie Bahnen 1 bis 3, jedoch in Amplifikationspuffer Nr. 2.

Figur 9 ist die photographische Abbildung eines Agarosegels mit nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Ampli-

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 13 -

fikationsprodukten. Es bedeuten (von links nach rechts): Bahn 1: 500 ng DNS-Längenstandardmarker Nr. III (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) und Bahn 2: cDNA des menschlichen myf3-Gens (aufgetragene Menge beträgt 3 μ l aus einem Endvolumen von 50 μ l nach beendeter Amplifikation).

Figur 10 ist die photographische Abbildung eines Agarosegels mit nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Amplifikationsprodukten. Es bedeuten (von links nach rechts): Bahn 1: cDNA des menschlichen Fibronectin-Gens (aufgetragene Menge beträgt 3 μ l aus einem Endvolumen von 50 μ l nach beendeter Amplifikation) und Bahn 2: 500 ng DNS-Längenstandardmarker Nr. III (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG).

Figur 11 ist eine photographische Abbildung einer "fluorescent multicolor" *in situ* Hybridisierung nach einem modifizierten Verfahren (Celeda et al., Z. Naturforsch. 47c (1992), 739-747) an menschlichen Metaphase-Chromosomen. Gelbe Hybridisierungsmarkierungen (FITC) zeigen die für das menschliche Chromosom #1 spezifische pUC 1.77 DNS-Probe aus Fig. 8, Bahn 1; rote Hybridisierungsmarkierungen (Texas Red) zeigen die für das menschliche Chromosom #8 spezifische DNS-Probe aus Fig. 8, Bahn 3.

Figur 12 ist eine photographische Abbildung einer "fluoreszierenden" *in situ* Hybridisierung unter Verwendung der cDNA des menschlichen myf3-Gens aus Fig. 9 nach einem modifizierten Verfahren (Celeda et al., Z. Naturforsch. 47c (1992), 739-747) mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Es bedeuten: Bild 1: Hybridisierung an menschliche, in Kultur gehaltene Rhabdomyosarkomzellen; und Bild 2: Hybridisierungen an menschliche, aus peripherem Blut gewonnenen Lymphozyten.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 14 -

1. Amplifikation einer für das Centromer des menschlichen Chromosoms #1 spezifischen DNS-Probe

6×10^{-9} g einer im Handel erhältlichen pUC 1.77 DNS-Probe für das menschliche Chromosom #1 wird zu einer Reaktionslösung (Endvolumen 50 μ l, "Amplifikationspuffer Nr. 1") zugegeben, die jeweils 0,8 nmol der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 10 mmol Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 3 mmol $MgCl_2$, 50 mmol KCl und 5 Einheiten einer im Handel erhältlichen Taq-Polymerase enthält.

Der Reaktionsansatz wird in einem im Handel erhältlichen Thermocycler eingebracht und 80 Wiederholungen ("Zyklen") der Reaktionssequenzen werden durchgeführt, wobei nach 40 Wiederholungen weitere 5 Einheiten der Taq-Polymerase zugegeben werden.

Die Reaktionsbedingungen einer Reaktionssequenz sind (1) Denaturieren der im Reaktionsgemisch enthaltenen Nukleinsäuren bei 90 °C für 2 Minuten und (2) Synthetisieren ("Elongation") eines neuen Nukleinsäurestranges unter Verwendung eines überstehenden Stranges als Matrize bei 72 °C für 3 Minuten.

In Figur 8, Bahn 1, ist das Ergebnis dieser Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

In Bahn 5 von Figur 8 ist ein Ergebnis mit der gleichen DNS-Probe dargestellt, wobei hier die Reaktionslösung (Endvolumen 50 μ l, "Amplifikationspuffer Nr. 2") jeweils 0,8 nmol der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 3 mmol $MgCl_2$, 160 mmol NaCl, 0,02 Vol.-% Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat) und 5 Einheiten einer im Handel erhältlichen Taq-Polymerase enthält.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 15 -

2. Amplifikation eines mikrodisektierten Segments vom Chromosom #1

Die gleichen, wie in Beispiel 1 aufgeführten Reaktionen werden durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 6×10^{-9} g eines mikrodisektierten Segments von Chromosom #1 verwendet wird.

Die Ergebnisse sind in Figur 8, Bahnen 2 (Amplifikationspuffer Nr. 1) und 6 (Amplifikationspuffer Nr. 2), dargestellt.

3. Amplifikation einer mikrodisektierten, für das Centromer des menschlichen Chromosoms #8 spezifischen Nukleinsäure-Probe

Die gleichen, wie in Beispiel 1 aufgeführten Reaktionen werden durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 6×10^{-9} g einer mikrodisektierten, für das Centromer des menschlichen Chromosoms #8 spezifischen Nukleinsäure-Probe verwendet wird.

Die Ergebnisse sind in Figur 8, Bahnen 3 (Amplifikationspuffer Nr. 1) und 7 (Amplifikationspuffer Nr. 2), dargestellt.

4. Amplifikation einer cDNA des menschlichen myf3-Gens

5×10^{-9} g einer myf-3 DNS-Probe werden zu einer Reaktionslösung (Endvolumen 50 μ l) zugegeben, die jeweils 0,8 nmol der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 3 mmol $MgCl_2$, 160 mmol NaCl, 0,02 Vol.-% Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) und 5 Einheiten einer im Handel erhältlichen Taq-Polymerase enthält.

Der Reaktionsansatz wird in einem im Handel erhältlichen Thermocycler eingebracht und 40 Wiederholungen ("Zyklen")

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 16 -

der Reaktionssequenzen werden durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen einer Reaktionssequenz sind (1) Denaturieren der im Reaktionsgemisch enthaltenen Nukleinsäuren bei 90 °C für 2 Minuten und (2) Synthetisieren ("Elongation") eines neuen Nukleinsäurestranges unter Verwendung eines überstehenden Stranges als Matrize bei 72 °C für 1 Minute.

In Figur 9, Bahn 2, ist das Ergebnis dieser Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

5. Amplifikation einer cDNA-Nukleinsäuresonde des menschlichen Fibronectin-Gens

5×10^{-9} g einer Fibronectin-DNS-Probe werden zu einer Reaktionslösung (Endvolumen 50 μ l) zugegeben, die jeweils 0,8 nmol der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 10 mmol Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 3 mmol $MgCl_2$, 50 mmol KCl und 5 Einheiten einer im Handel erhältlichen Taq-Polymerase enthält.

Der Reaktionsansatz wird in einem im Handel erhältlichen Thermocycler eingebracht und 80 Wiederholungen ("Zyklen") der Reaktionssequenzen werden durchgeführt, wobei nach 40 Wiederholungen weitere 5 Einheiten der Taq-Polymerase zugegeben werden.

Die Reaktionsbedingungen einer Reaktionssequenz sind (1) Denaturieren der im Reaktionsgemisch enthaltenen Nukleinsäuren bei 94 °C für 2 Minuten, (2) Anlagerung ("Annealing") bei 54 °C für 2 Minuten und (3) Synthetisieren ("Elongation") eines neuen Nukleinsäurestranges unter Verwendung eines überstehenden Stranges als Matrize bei 72 °C für 2 Minuten.

In Figur 10, Bahn 1, ist das Ergebnis dieser Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 17 -

6. In situ Hybridisierungen

Die in den Figuren 11 und 12 dargestellten *in situ* Hybridisierungen werden nach dem von Celeda et al. (Z. Naturforsch. 47c (1992), 739-747) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 18 -

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren, wobei der Reaktionsansatz ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül ("Startermolekül") mit einer als Starter wirkenden endständigen Nukleotidsequenz und ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül ("Matrizenmolekül") mit mindestens einer zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz eines Startermoleküls befähigten Nukleotidsequenz enthält, umfassend die Schritte
 - (a) Anlagern der endständigen im Startermolekül enthaltenen Nukleotidsequenz an eine im Matrizenmolekül enthaltenen Nukleotidsequenz unter Bildung eines überstehenden Stranges des Matrizenmoleküls,
 - (b) Synthetisieren eines Verlängerungsproduktes durch Induzieren mit der als Starter wirkenden endständigen Nukleotidsequenz des Startermoleküls unter Verwendung des überstehenden Stranges des Matrizenmoleküls als Matrize in Gegenwart von Nukleotiden und mindestens einem zur Synthese des Verlängerungsproduktes geeigneten Agens, wobei eine das Verlängerungsprodukt enthaltende Nukleinsäure ("Reaktionsprodukt") erhalten wird,
 - (c) Trennen des Reaktionsproduktes vom Matrizenmolekül, und
 - (d) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (a) bis (c).
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Matrizenmolekül die komplementäre Sequenz des Startermoleküls ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Startermolekül und das Matrizenmolekül gleich sind.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 19 -

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Startermolekül kovalent an das Matrizenmolekül gebunden ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Reaktionsprodukt eine endständige Nukleotidsequenz enthält, die zur Anlagerung an mindestens einer Nukleotidsequenz des Matrizenmoleküls befähigt ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine zur Anlagerung an die endständige Nukleotidsequenz des Startermoleküls befähigte Nukleotidsequenz des Matrizenmoleküls endständig ist und im Schritt (b) das Matrizenmolekül als Startermolekül und das Startermolekül als Matrizenmolekül gemäß den Definitionen in Anspruch 1 verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die zur Anlagerung befähigten Nukleotidsequenzen im Startermolekül und/oder Matrizenmolekül repetitive Sequenzen sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Startermolekül und/oder das Matrizenmolekül aus chromosomaler DNS stammt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der überstehende Strang des Matrizenmoleküls mit einer genetischen, kanzerogenen oder infektiösen Krankheit verbunden ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die zur Anlagerung befähigten Nukleotidsequenzen des Startermoleküls und/oder des Matrizenmoleküls mindestens eine Erkennungssequenz für Endonukleasen enthalten.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei zusätzlich das Reaktionsprodukt jeder Reaktionssequenz (a)

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 20 -

bis (c) als Startermolekül und/oder als Matrizenmolekül gemäß den Definitionen in Anspruch 1 verwendet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Agens T4-DNA-Polymerase, *E. coli* DNA-Polymerase I, Reverse Transkriptase oder ein synthetisierendes und/oder Hitze-stabiles Enzym ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei mindestens ein Teil der Nukleotide eine Markierung aufweist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Reaktionsprodukte markiert werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Reaktionsprodukt mindestens einmal gespalten wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Reaktionsprodukt physikalisch und/oder chemisch und/oder enzymatisch gespalten wird.
17. Verwendung der nach einem der Ansprüche 1 bis 16 hergestellten Reaktionsprodukte als Nukleinsäuresonden.
18. Diagnostischer Kit zum Nachweis von spezifischen in Nukleinsäuren enthaltenen Sequenzen und/oder von Nukleinsäuren, enthaltend die nach einem der Ansprüche 1 bis 16 hergestellten Reaktionsprodukte.

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 1/8 -

Fig. 1

Reaktionsansatz:

-----TTT---

(Matrizenmolekül)

AAA-----

(Startermolekül)

Schritt (a):

-----TTT---

AAA-----

Schritt (b):

-----TTT---

*****AAA-----

(Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

*****AAA-----

Fig. 2

Reaktionsansatz:

TTT-----TTT---

(Matrizenmolekül)

AAA-----

(Startermolekül)

Schritt (a):

TTT-----TTT---

AAA-----

Schritt (b):

TTT-----TTT---

AAA*****AAA-----

(Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

AAA*****AAA-----

AAA*****AAA*****AAA-----

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 2/8 -

Fig. 3

Reaktionsansatz:
 AAA-----TTT--- (Matrizenmolekül)
 AAA-----TTT--- (Startermolekül)

Schritt (a):
 AAA-----TTT---
 AAA-----TTT---

Schritt (b):
 AAA-----TTT---
 TTT*****AAA-----TTT--- (Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:
 TTT*****AAA-----TTT---

Fig. 4

Reaktionsansatz:
 AAA-----TTT (Matrizenmolekül)
 AAA-----TTT (Startermolekül)

Schritt (a):
 AAA-----TTT
 AAA-----TTT

Schritt (b):
 AAA-----TTT*****AAA (Reaktionsprodukt)
 TTT*****AAA-----TTT (Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:
 AAA-----TTT*****AAA
 TTT*****AAA-----TTT
 AAA-----TTT*****AAA*****TTT*****AAA
 TTT*****AAA*****TTT*****AAA-----TTT

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 3/8 -

Fig. 5

Reaktionsansatz:
 AAA-----AAA----- (Matrizenmolekül)
 |||||
 TTT----- (Startermolekül)

Schritt (a):
 AAA-----AAA-----
 TTT-----

Schritt (b):
 AAA-----AAA-----
 TTT*****TTT----- (Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

TTT*****TTT-----
 TTT*****TTT*****TTT-----

Fig. 6

Reaktionsansatz:
 AAA-----AAA (Matrizenmolekül)
 |||||
 TTT-----TTT (Startermolekül)

Schritt (a):
 AAA-----AAA
 TTT-----TTT

Schritt (b):
 AAA-----AAA*****AAA (Reaktionsprodukt)
 TTT*****TTT-----TTT (Reaktionsprodukt)

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

AAA-----AAA*****AAA
 TTT*****TTT-----TTT
 AAA-----AAA*****AAA*****AAA
 TTT*****TTT*****TTT-----TTT
 AAA-----AAA*****AAA*****AAA*****AAA
 TTT*****TTT*****TTT*****TTT-----TTT

WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 4/8 -

Fig. 7

Reaktionsansatz:

kovalente Bindung

AAA-----:-----TTT----- (Nukleinsäure)
 (Startermolekül) (Matrizenmolekül)

Schritt (a):

Schleife→ (AAA
 :-----TTT-----

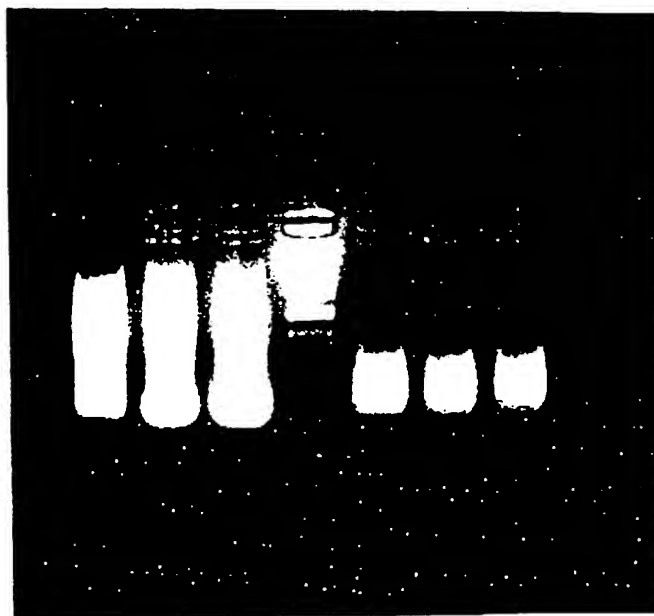
Schritt (b):

(AAA*****
 :-----TTT-----

Mögliche Reaktionsprodukte nach einer Wiederholung:

*****AAA-----:-----TTT-----
 *****TTT*****AAA--//--TTT-----

Fig. 8



WO 96/05296

-5/8-

PCT/DE95/01003

Fig. 9

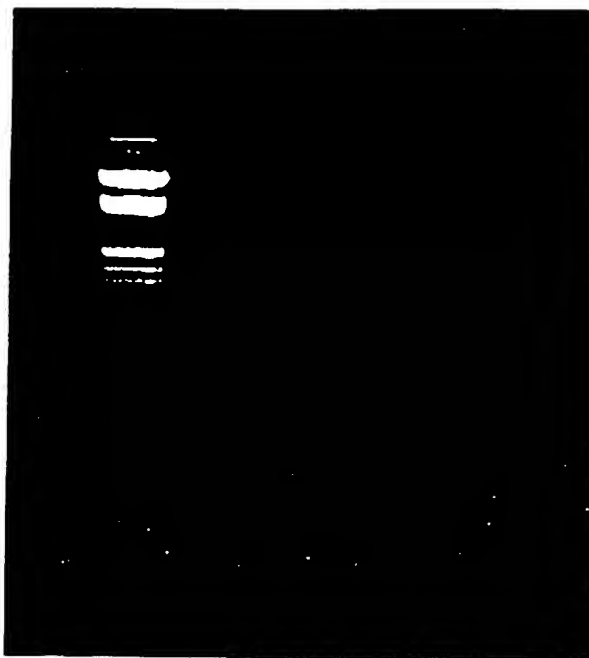


Fig. 10



WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 6/8 -

Fig. 11



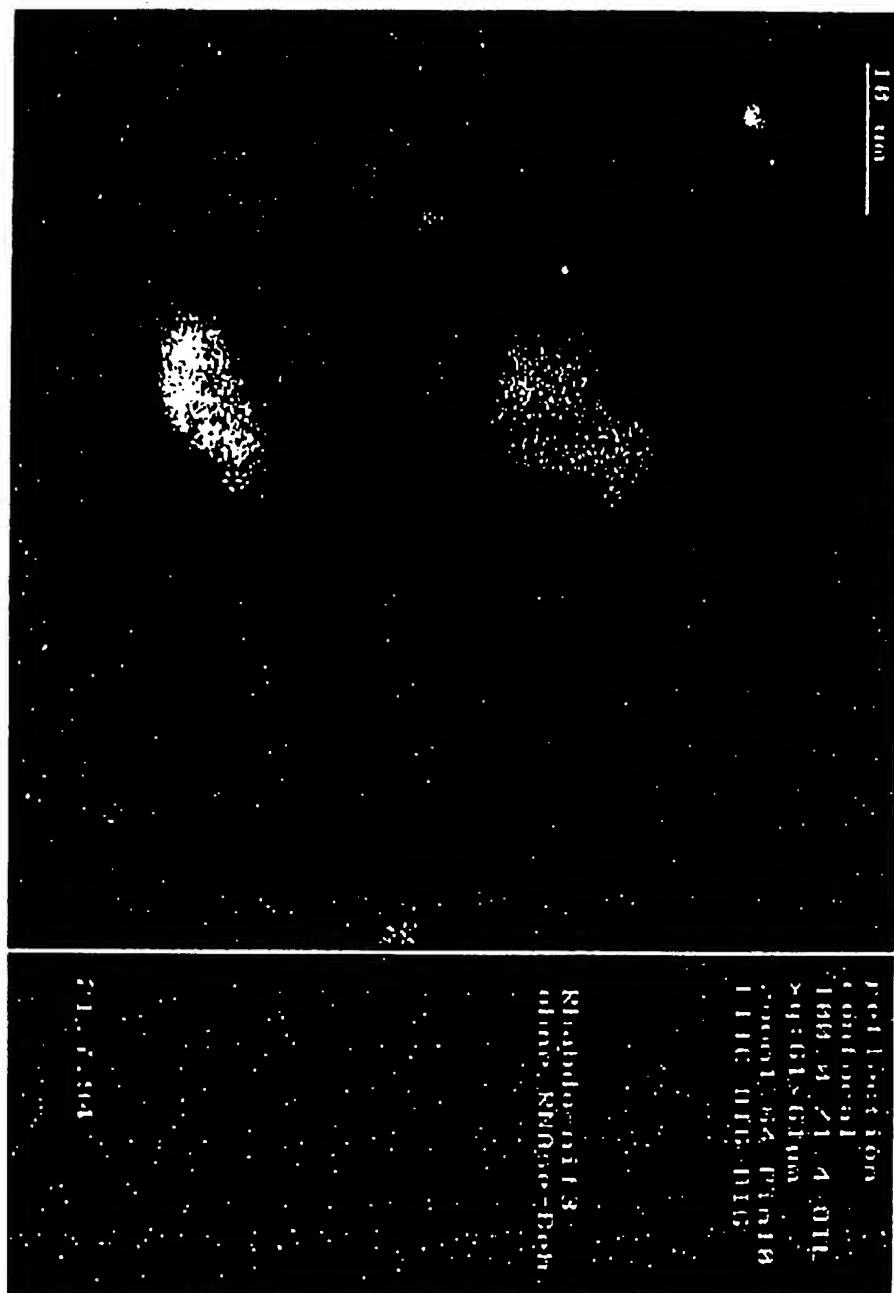
WO 96/05296

PCT/DE95/01003

- 7/8 -

Fig. 12

Bild 1



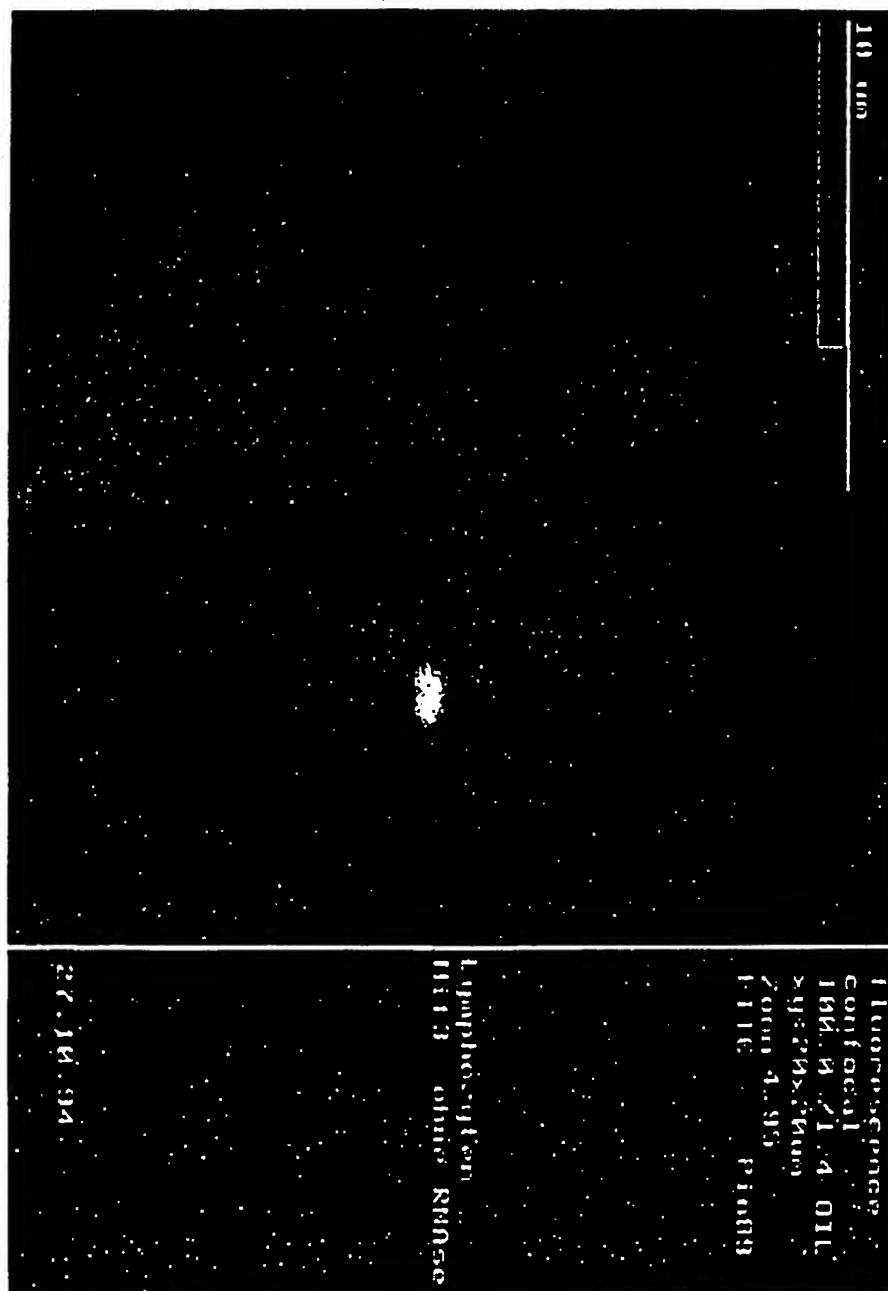
WO 96/05296

-8/8-

PCT/DE95/01003

Fig. 12

Bild 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. J Application No
PCT/DE 95/01003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/10 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 09245 (UNIV PITTSBURGH) 13 May 1993	1,2,6,7, 10-12, 15-18
Y	see the whole document ---	3-5,9
X	WO,A,93 19202 (US ARMY) 30 September 1993	1,5,6, 10,12-16
Y	see the whole document ---	3,4,9
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 21, 11 November 1990 IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, page 6460 W.A. RUDERT AND M. TRUCCO 'DNA polymers of protein binding sequences generated by PCR'	1,2,6,7, 10-12, 15-18
Y	see the whole document ---	3-5,9
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 1995

Date of mailing of the international search report

0 8. 12. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern : Application No

PCT/DE 95/01003

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 17, 11 September 1991 page 4780 XP 000227512 IJDO J W ET AL 'IMPROVED TELOMERE DETECTION USING A TELOMERE REPEAT PROBE (TTAGG) _N GENERATED BY PCR'	1,2,5-8, 10-14, 17,18
Y	see the whole document ---	3,4,9
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 199, no. 2, 1 December 1991 pages 184-190, XP 000236491 WHITE M J ET AL 'CONCATEMER CHAIN REACTION: A TAQ DNA POLYMERASE-MEDIATED MECHANISM FOR GENERATING LONG TANDEMLY REPETITIVE DNA SEQUENCES'	1,2,6-8, 10-14, 17,18
Y	see the whole document ---	3-5,9
Y	WO,A,93 09246 (UNIV IOWA RES FOUND) 13 May 1993 see the whole document ---	4,5
Y	WO,A,93 23572 (GERON CORP ;UNIV CALIFORNIA SAN FRANCISCO (US)) 25 November 1993 see page 52, line 15 - page 63, line 14; examples 1,4-6 ---	9
A	BIOTECHNIQUES, vol. 16, no. 2, February 1994 NATICK, MA, US, page 242,244,246 L.-M. HUANG AND K.-T. JEANG 'Long-range jumping of incompletely extended polymerase chain fragments generates unexpected products' see the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No
PCT/DE 95/01003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9309245	13-05-93	EP-A- 0656065 JP-T- 7500734	07-06-95 26-01-95
WO-A-9319202	30-09-93	AU-B- 3798393 EP-A- 0631636 JP-T- 7507201	21-10-93 04-01-95 10-08-95
WO-A-9309246	13-05-93	US-A- 5411875	02-05-95
WO-A-9323572	25-11-93	AU-B- 4374093 CA-A- 2135648 EP-A- 0642591	13-12-93 25-11-93 15-03-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 95/01003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 09245 (UNIV PITTSBURGH) 13.Mai 1993	1,2,6,7, 10-12, 15-18
Y	siehe das ganze Dokument ---	3-5,9
X	WO,A,93 19202 (US ARMY) 30.September 1993	1,5,6, 10,12-16
Y	siehe das ganze Dokument ---	3,4,9
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 18, Nr. 21, 11.November 1990 IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, Seite 6460 W.A. RUDERT AND M. TRUCCO 'DNA polymers of protein binding sequences generated by PCR'	1,2,6,7, 10-12, 15-18
Y	siehe das ganze Dokument ---	3-5,9
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. November 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08.12.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 95/01003

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 19, Nr. 17, 11.September 1991 Seite 4780 XP 000227512 IJDO J W ET AL 'IMPROVED TELOMERE DETECTION USING A TELOMERE REPEAT PROBE (TTAGG) _N GENERATED BY PCR'	1,2,5-8, 10-14, 17,18
Y	siehe das ganze Dokument ---	3,4,9
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 199, Nr. 2, 1.Dezember 1991 Seiten 184-190, XP 000236491 WHITE M J ET AL 'CONCATEMER CHAIN REACTION: A TAQ DNA POLYMERASE-MEDIATED MECHANISM FOR GENERATING LONG TANDEMLY REPETITIVE DNA SEQUENCES'	1,2,6-8, 10-14, 17,18
Y	siehe das ganze Dokument ---	3-5,9
Y	WO,A,93 09246 (UNIV IOWA RES FOUND) 13.Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	4,5
Y	WO,A,93 23572 (GERON CORP ;UNIV CALIFORNIA SAN FRANCISCO (US)) 25.November 1993 siehe Seite 52, Zeile 15 - Seite 63, Zeile 14; Beispiele 1,4-6 ---	9
A	BIOTECHNIQUES, Bd. 16, Nr. 2, Februar 1994 NATICK, MA, US, Seite 242,244,246 L.-M. HUANG AND K.-T. JEANG 'Long-range jumping of incompletely extended polymerase chain fragments generates unexpected products' siehe das ganze Dokument -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen
PCT/DE 95/01003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9309245	13-05-93	EP-A- 0656065 JP-T- 7500734	07-06-95 26-01-95
WO-A-9319202	30-09-93	AU-B- 3798393 EP-A- 0631636 JP-T- 7507201	21-10-93 04-01-95 10-08-95
WO-A-9309246	13-05-93	US-A- 5411875	02-05-95
WO-A-9323572	25-11-93	AU-B- 4374093 CA-A- 2135648 EP-A- 0642591	13-12-93 25-11-93 15-03-95